

①9 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE  
INSTITUT NATIONAL  
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE  
PARIS

①1 N° de publication :  
(à n'utiliser que pour les  
commandes de reproduction)

**2 691 880**

②1 N° d'enregistrement national :

**92 06839**

⑤1 Int Cl<sup>5</sup> : A 23 L 1/221

⑫

**DEMANDE DE BREVET D'INVENTION**

**A1**

②2 Date de dépôt : 05.06.92.

③0 Priorité :

⑦1 Demandeur(s) : V. MANE FILS (S.A.) — FR.

⑦2 Inventeur(s) : Mane Jean et Zucca Joseph.

④3 Date de la mise à disposition du public de la  
demande : 10.12.93 Bulletin 93/49.

⑤6 Liste des documents cités dans le rapport de  
recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du  
présent fascicule.*

⑥0 Références à d'autres documents nationaux  
apparentés :

⑦3 Titulaire(s) :

⑦4 Mandataire : Cabinet Plasseraud.

⑤4 Procédé d'obtention d'arôme naturel de vanille par traitement des gousses de vanille et arôme obtenu.

⑤7 L'invention a pour objet un procédé d'obtention d'un  
arôme vanille naturel consistant à mettre en contact des  
gousses de vanille avec des enzymes du type pectinase,  
cellulase et/ou hémicellulase, à faire agir une enzyme du  
type B-glucosidase, et à extraire l'arôme vanille ainsi obtenu.

**FR 2 691 880 - A1**



PROCEDE D'OBTENTION D'ARÔME NATUREL DE VANILLE  
PAR TRAITEMENT DES GOUSSES DE VANILLE ET ARÔME OBTENU

La présente invention a pour objet un procédé d'obtention d'un arôme vanille par traitement de gousses de vanille. Elle vise également l'arôme obtenu à l'aide de ce procédé.

La vanille naturelle est produite par le vanillier à partir de glucose photosynthétisé selon un mécanisme CAM intermédiaire entre celui de CALVIN (C3) et celui de HATCH-SLACK (C4). Le glucose se transforme tout d'abord en Erythrose 4 Phosphate et en phosphoénol pyruvate qui, eux-mêmes, sont à l'origine des différents produits intermédiaires qui conduisent à la formation de glucovanilline. La glucovanilline est une forme glycosylée de la vanilline et représente une forme de stockage et de détoxification pour le vanillier.

Cette glucovanilline se forme au cours de la maturation du fruit, sur le vanillier, en 7 à 8 mois. La gousse mature contient 20% de glucovanilline dans la région du pédoncule, 40% au centre et 40% dans la partie extrême.

La vanilline dérive de la glucovanilline par hydrolyse par la  $\beta$ -glucosidase présente dans le fruit, au cours de ce qui est communément appelé la "préparation" des gousses. C'est au cours des 12 premiers jours de la "préparation" des gousses que se déroulent les principales réactions conduisant à la vanilline : plus de 50% de la vanilline est alors déjà synthétisée. Les étapes ultérieures permettent le développement de la suavité de l'arôme de la vanille.

Au cours de cette "préparation" qui dure plusieurs mois, se produit une importante perte de vanilline, due au lessivage de cette dernière ou à sa sublimation. Ainsi une gousse en fin de "préparation" contient seulement environ 2% de vanilline au lieu des 5 à 6% que l'on pourrait attendre d'après la teneur en glucovanilline présente dans le fruit mature. Afin d'essayer d'éviter ces pertes, tout à fait

sensibles, en vanilline, il a déjà été proposé d'extraire la vanilline des gousses, non plus en fin de "préparation", mais tout de suite ou peu de temps après la cueillette.

5           Ainsi le brevet français 88 10473 a proposé de procéder à la congélation des gousses vertes mûres de vanille, à une température comprise entre -5°C et -30°C puis de procéder à leur réchauffement avant d'extraire l'arôme de façon classique, par un solvant.

10           Selon ce brevet, ce procédé de congélation-décongélation permettrait d'obtenir au moins 80% de la vanilline escomptée d'après la teneur en glucovanilline présente dans les gousses vertes à la cueillette.

15           Ce procédé n'est cependant pas satisfaisant sur tous les plans. En effet, d'une part, il est assez dispendieux en énergie et, d'autre part, le rendement en vanilline ne reste que partiel.

20           Il est du mérite de la Société demanderesse d'avoir mis au point un procédé permettant l'obtention d'arôme de vanille avec un très haut rendement et dans des conditions opératoires relativement douces.

25           Le procédé selon l'invention est ainsi caractérisé par le fait que l'on met en présence des gousses de vanille avec des enzymes capables d'assurer la destruction, tout au moins partielle, des tissus et des cellules des gousses ainsi que la transformation de la glucovanilline en vanilline à l'aide d'au moins une  $\beta$ -glucosidase.

30           Les enzymes capables d'assurer la destruction, tout au moins partielle, des tissus et des cellules des gousses sont de préférence choisies parmi les enzymes de type pectinasique, cellulasique et hémicellulasique. On peut ainsi faire appel à des enzymes telles que le PECTINEX ULTRA SP ou le ROHAMENT PC. Ces enzymes du type pectinase, cellulase ou hémicellulase, peuvent être employées simultanément ou de façon séquentielle. Par cette action de  
35           ces enzymes, qui conduit à la destruction des structures tissulaires et cellulaires des gousses, un contact beaucoup

plus important et beaucoup plus intense entre la glucovanilline présente dans le fruit et la  $\beta$ -glucosidase naturellement présente dans celui-ci peut être assuré. Le procédé conforme à l'invention permet donc de transformer  
5 très facilement, du fait de ces actions enzymatiques combinées, la presque totalité de la gluco- vanilline présente dans le fruit mature en vanilline. Selon une réalisation préférentielle de l'invention, l'action hydrolytique de la  $\beta$ -glucosidase naturelle du fruit est  
10 renforcée par l'addition de  $\beta$ -glucosidase exogène. Une telle  $\beta$ -glucosidase peut être trouvée aisément dans des préparations enzymatiques industrielles. On peut ainsi par exemple citer la POLYSACCHARASE L 151 ou la  $\beta$ -glucosidase d'amandes commercialisée par la Société SIGMA.

15 Conformément au procédé selon l'invention, on met tout d'abord les gousses ayant subi un broyage préalable en présence d'eau, puis on ajoute les différentes préparations d'enzymes en une quantité de 0.1 à 7% par rapport au poids des gousses (ce poids étant exprimé en matière sèche), et de  
20 préférence en une quantité de 0,5 à 5% par rapport au poids des gousses.

La quantité d'eau ajoutée aux gousses est de préférence comprise entre 10 et 150% du poids sec des gousses et, de préférence située entre 40 et 80% de ce  
25 poids. Le broyage préalable des gousses peut, quant à lui, s'effectuer par tous moyens classiques.

La suspension de gousses broyées dans l'eau mise en présence des différentes préparations d'enzymes choisies parmi le groupe des enzymes de type pectinasique, cellulasi-  
30 que et/ou hémicellulasique et éventuellement  $\beta$ -glucosidasi- que est alors agitée, à une vitesse située par exemple entre 50 et 1000 tours/minute et, de préférence entre 100 et 500 tours/minute, la température du milieu réactionnel étant maintenue entre 15 et 60°C, et de préférence entre 30 et  
35 55°C. Le temps de contact entre la suspension de gousses broyées et les différentes préparations enzymatiques est

alors maintenu pendant une durée de 1 heure à 48 heures, et de préférence entre 3 heures et 24 heures. Le pH du milieu réactionnel est quant à lui ajusté à une valeur comprise entre 4.5 et 6.5 à l'aide de soude ou d'acide phosphorique par exemple. Le pH peut cependant être ajusté et régulé à des valeurs différentes au cours du procédé, ceci afin d'optimiser l'action des différentes enzymes utilisées. De préférence, conformément à l'invention, on fait subir le traitement enzymatique ci-dessus décrit aux gousses vertes matures mais il n'est cependant pas exclu d'utiliser le procédé selon l'invention sur des gousses séchées, préparées selon les procédés traditionnels, ceci afin d'augmenter le rendement de récupération de la vanilline contenue dans lesdites gousses.

Une fois le traitement enzymatique terminé, la vanilline est extraite du milieu réactionnel par des moyens classiques connus en soi. Ainsi on peut extraire la vanilline à l'aide d'éthanol aqueux.

L'invention pourra être mieux comprise à l'aide des exemples qui suivent et qui sont donnés à titre purement illustratif.

#### 20 EXEMPLE 1

Un flacon contenant 50 grammes de gousses de vanille d'Indonésie âgées d'environ 8 mois, préalablement broyées en présence de 60% d'eau est amené à une température de 45°C puis maintenu à cette température pendant 3 heures, sous agitation à une vitesse de 150 tours/minute. Une quantité de 1 gramme de préparation enzymatique de marque PECTINEX ULTRA SP, titrant 26000 PGU/gramme est alors ajoutée dans cette suspension de gousses broyées (1 unité PGU correspond à la quantité d'enzyme nécessaire pour réduire la viscosité d'une solution standard d'acide polygalacturonique à 20°C, pH 3 et en 30 minutes). Après un temps d'incubation de 3 heures, toujours à une température de 45°C et sous une agitation de 150 t/minute, une quantité de 1 gramme de préparation enzymatique de marque POLYSACCHARASE 151 L,

contenant une quantité importante de B-glucosidases (10 000 U/g), est additionnée au milieu et l'ensemble est agité pendant 12 heures à 45°C, le pH étant maintenu tout au long de la réaction à une valeur de 5.5 (une unité B-glucosidase est définie comme le nombre de micromoles de glucose produit en une minute, à 65°C et à pH 5.5 à partir d'une solution de B-glucosides d'orge). A l'issue du traitement ainsi décrit, la vanilline a été extraite du milieu réactionnel à l'aide d'éthanol.

La quantité de vanilline récupérée est de 6% (sec/sec).

Les rapports vanilline/aldéhyde para-hydroxy benzoïque, vanilline/acide vanillique et vanilline/acide para-hydroxy benzoïque sont respectivement égaux à 17, à 25, et à 100.

Les mêmes gousses d'Indonésie, mais ayant subi un séchage et une "préparation" de type conventionnel, ont été extraite à l'éthanol. Le rendement en vanilline n'est en ce cas que de 1.75% (sec/sec).

#### EXEMPLE 2

Des gousses de Madagascar "préparées" traditionnellement donnent un rendement en vanilline de 1,85% sec/sec lorsqu'elles sont extraites par une méthode classique alors qu'elles conduisent à un rendement de 2.15% lorsque le traitement enzymatique conforme à l'invention leur est appliqué.

#### EXEMPLE 3

Un réacteur de 2000 litres contenant 550 kg de gousses de Madagascar "préparées" et broyées est inoculé avec un mélange de 11kg de pectinase et de cellulase titrant 26 000 PGU/g, de marque PECTINEX ULTRA SP. Le milieu est ensuite laissé macérer pendant 6 heures à 45°C avant que ne soient rajoutés 11 kg de préparation enzymatique de marque POLYSACCHARASE 151 L contenant 10 000 U/g de B-glucosidases.

Après 12 heures d'incubation à une température de 45°C et sous une vitesse d'agitation d'environ 150 tours/mn,

le milieu est traité à l'éthanol afin d'extraire la vanilline.

Rapportée au poids de gousses sèches de vanille, la teneur en vanilline récupérée est de 2,05%.

5 Les rapports entre vanilline et aldéhyde PHB, entre vanilline et acide vanillique et entre vanilline et acide PHB sont respectivement de 13.5, de 15.7 et 64.

10 Lorsqu'on effectue le même traitement mais sans le traitement enzymatique conforme à l'invention, le rendement en vanilline n'est plus que de 1,80% sec/sec.

REVENDEICATIONS

1. Procédé d'obtention d'un arôme vanille naturel caractérisé par le fait que l'on met en contact des gousses de vanille avec des enzymes du type pectinase, cellulase  
5 et/ou hémicellulase, que l'on fait agir une enzyme du type  $\beta$ -glucosidase, et que l'on extrait l'arôme vanille ainsi obtenu.

2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé par le fait que la mise en contact des gousses de vanille avec  
10 les enzymes s'effectue dans un milieu aqueux comprenant de 10 à 150% d'eau, et de préférence de 40 à 80% d'eau par rapport à la matière sèche des gousses traitées.

3. Procédé selon l'une des revendications 1 ou 2, caractérisé par le fait que les gousses de vanille sont  
15 broyées et macérées dans un milieu aqueux avant la mise en contact avec les enzymes.

4. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé par le fait que la mise en contact des gousses de vanille avec les enzymes s'effectue à une  
20 température comprise entre 15 et 60°C, de préférence entre 35 et 55°C, à un pH de 4.5 à 6.5, et sous agitation.

5. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé par le fait que le temps de mise en contact des gousses de vanille avec les enzymes est de 1  
25 heure à 48 heures et de préférence de 3 heures à 24 heures.

6. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisé par le fait que l'enzyme du type  $\beta$ -glucosidase est constituée par l'enzyme naturelle du fruit et par une  $\beta$ -glucosidase ajoutée.

7. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisé par le fait que les quantités respectives d'enzymes de type pectinase, cellulase et/ou hémicellulase, et éventuellement de type  $\beta$ -glucosidase, sont de 0,1 % à  
30 7 %, et de préférence de 0,5 % à 5 % par rapport au poids sec de gousses de vanille.



8. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, caractérisé par le fait que les gousses de vanille sont des gousses vertes ayant mûri sur le vanillier pendant une durée comprise entre 7 et 9 mois environ, ou des gousses de vanille séchées préparées selon les procédés traditionnels.

9. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, caractérisé par le fait que l'arôme de vanille est extrait à l'aide de moyens classiques, et de préférence par extraction à l'alcool éthylique.

INSTITUT NATIONAL  
de la  
PROPRIETE INDUSTRIELLE

RAPPORT DE RECHERCHE  
établi sur la base des dernières revendications  
déposées avant le commencement de la recherche

N° d'enregistrement  
national

FR 9206839  
FA 472685

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS			Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
X	FR-A-1 156 084 (MC CORMICK) * page 1, colonne 2, alinéa 6 * * page 2, colonne 1, alinéa 5 - alinéa 7 * * page 2, colonne 2, alinéa 5 * * page 3, colonne 1, alinéa 5 - colonne 2, alinéa 2 *	1-6	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int. Cl.5)
Y	--- DATABASE WPIL Section Ch, Week 8316, Derwent Publications Ltd., London, GB; Class D, AN 83-38370K & JP-A-58 043 757 (HASEGAWA) 14 Mars 1983 * abrégé *	1-9	
Y	--- EP-A-0 416 713 (GIST-BROCADES ET I.N.R.A.) * page 31, ligne 14 - ligne 32 * * revendications *	1-9	
A	--- FR-A-2 625 750 (FLAVOTROP BIOSYSTEMS) * revendications *	1-9	
A	--- FR-A-2 443 265 (J.-M.COTTE) * le document en entier *	1-9	
A	--- EP-A-0 332 281 (GIST-BROCADES ET I.N.R.A.) * revendications *	1-9	
A	--- EP-A-0 354 118 (ELF AQUITAINE) * le document en entier *	1	
A	--- FOOD RESEARCH 1943, pages 343 - 351 F.E.ARANA 'Action of a beta-glucosidase in the curing of vanilla' * le document en entier *	1	
E	----- FR-A-2 680 798 (PERNOD RICARD) * Page 2, ligne 26 à page 3, ligne 2 ; Revendications *	1,3,6	A23L C12P C11B
Date d'achèvement de la recherche 02 MARS 1993			Examinateur VAN MOER A.M.J.
<b>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</b> X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire			T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons ----- & : membre de la même famille, document correspondant